Spezifische Effekte der Einwirkung von Penicillin auf Escherichia coli B

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Uli Schwarz

aus Biberach/Riß

1964

7651

1963

Spezifische Effekte der Einwirkung von Penicillin auf Escherichia coli B

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Uli S c h w a r z

aus Biberach/Riß

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 12.Dez.1963

Dekan: Prof. Dr. G. Möllenstedt

1. Berichterstatter: Prof. Dr.Dr. W. Weidel

2. Berichterstatter: Prof. Dr.Dr. G. Weitzel

Inhaltsverzeichnis

Kapitel I : Einleitung 1

Kapitel II : Isolierung DAP- haltiger, löslicher Substanzen aus penicillininduzierten Sphäroplasten von Escherichia coli B 5

Material und Methoden 7

Ergebnisse und Diskussion 14

Kapitel III : Versuche zur Aufklärung des Ursprungs der DAP- haltigen Oligopeptide unter Anwendung der Isotopentechnik 19

Material und Methoden 19

Ergebnisse und Diskussion 25

Kapitel IV : Inkubation von ^{14}C-DAP- markierten Sphäroplastenmembranen mit Lysozym. Charakterisierung der dabei entstehenden löslichen Muropeptide 33

Material und Methoden 33

Ergebnisse und Diskussion 35

Zusammenfassende Diskussion 38

Zusammenfassung 42

Literaturverzeichnis 43

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1960 bis August 1963 im Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Weidel, in Tübingen.

Herrn Professor Dr.Dr. W. Weidel bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas, die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für seine stetige Förderung der Arbeit in jeder Beziehung. Auch den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe im Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Weidel, danke ich sehr für fruchtbare Diskussionen.

Kapitel I

Einleitung

Die ersten Untersuchungen, welche sich mit der Wirkung von Penicillin auf die Bakterienzelle befaßten, waren morphologischer Art. Schon 1946 äußerte Duguid die Ansicht[1], daß die morphologischen Veränderungen, welche wachsende Bakterien unter Penicillineinwirkung erfahren - das Auftreten von Ausstülpungen an der Zellwand und die Bildung anormaler, bizarrer Zellformen - ihre Ursache in einer Beeinflussung der Zellwand haben könnten. Später wurde gezeigt, daß gramnegative Bakterien in hypertonischer Rohrzuckerlösung unter Penicillineinfluß zu völlig runden, ballonförmigen Gebilden, später als Sphäroplasten bezeichnet[7] umgeformt werden[2)-6)]. Diese osmotisch und mechanisch sehr empfindlichen Zellformen können nach Entfernung des Antibioticums unter geeigneten Bedingungen wieder zur normalen Stäbchenform revertieren[2)-5)]. Dies besagt, daß unter Penicillin zwar das die Form und Festigkeit der Zelle bestimmende Strukturelement angegriffen und verändert wird, daß jedoch dann, wenn die Bakterien durch osmotischen Schutz vor einer Lyse bewahrt werden, die Zellen in der Lage sind, die durch das Antibioticum hervorgerufenen Schäden wieder zu reparieren. Lederberg kam deshalb zu der Auffassung, daß die Zellwand die durch Penicillin attackierte Struktur der Bakterienzelle darstelle[2)-4)].

Präzise Aussagen über die durch Penicillin beeinflußte Struktur der Colizelle waren allerdings erst dann möglich, als es Weidel und Mitarbeitern[8)-11)] gelungen war, aus der komplex aufgebauten Zellwand von Escherichia coli B eine chemisch definierte Strukturkomponente zu isolieren, welche in Gestalt und Dimensionen der Zelle entspricht und von der gezeigt werden konnte, daß allein sie für die Festigkeit der Zellwand verantwortlich ist[8)].

Diese nach einem Nomenklaturvorschlag von Weidel[12)] als Sacculus bezeichnete Struktur stellt ein in sich geschlos-

senes, beutelförmiges Makromolekül dar, aufgebaut aus kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten. Das den Sacculus bildende Polymer wird als Murein bezeichnet; die untereinander sowohl durch Glykosid- als auch durch Peptidbindungen verknüpften Untereinheiten heißen Muropeptide. Per definitionem besteht das Murein aus dem Minimum des für den Aufbau eines intakten Sacculus unbedingt erforderlichen Baumaterials. In der Zelle ist der Sacculus mit teils kovalent, teils lockerer gebundenen, im chemischen Aufbau vom Murein klar unterscheidbaren Komponenten vergesellschaftet[8), 9), 13)]. Dieses "Zubehör" kann vom Sacculus durch geeignete Methoden abgelöst werden, ohne daß dabei dessen fester Zusammenhalt verloren geht[9),10),11),14),15)]. Wird der isolierte Sacculus mit Lysozymen inkubiert[16)-21)], zerfällt das Murein in seine Untereinheiten, deren Strukturformeln teilweise ermittelt wurden[20)-24)]. Die in einem molaren Verhältnis von etwa 1 : 1[25), 26)] anfallenden Hauptkomponenten C6 und C3 zeigen folgenden Bau:

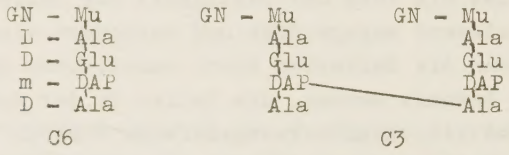
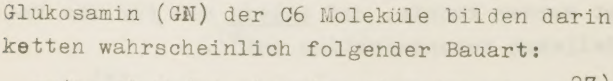


Abb. 1 Strukturformeln der Muropeptide C6 und C3

Abkürzungen: GN = N-Acetyl-glukosamin
Mu = N-Acetyl-muraminsäure
Ala= Alanin
Glu= Glutaminsäure
DAP=α,ε- Diaminopimelinsäure

Ohne weitere chemische Komponenten postulieren zu müssen, kann aus diesen beiden Untereinheiten ein in sich geschlossener Sacculus konstruiert werden[12)]. Die glykosidisch verbundenen azetylierten Aminozucker Muraminsäure (Mu) und Glukosamin (GN) der C6 Moleküle bilden darin Polymuropeptidketten wahrscheinlich folgender Bauart:



[27)-29].

Eine Quervernetzung dieser Ketten untereinander erfolgt durch Bindungen zwischen den Peptidseitenketten zweier benachbarter, verschiedenen Polymuropeptidsträngen angehörender C6 Moleküle. Dabei ist wahrscheinlich die DAP einer C6-Einheit über eine Peptidbindung mit dem carboxylendständigen Alanin eines weiteren C6 Moleküls verknüpft. Zwei auf diese Weise miteinander verbundene C6 Untereinheiten liefern bei Inkubation des Sacculus mit Lysozymen, wobei die ß(1-4 Bindungen des Aminozuckergerüsts gespalten werden[27), 28), 30)], Muropeptide vom Typ C3.

Der Sacculus grampositiver Bakterien wurde bis jetzt zwar noch nicht frei von jeglichem, nicht dem Sacculus zuzuschreibendem Zubehör isoliert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß auch grampositive Zellen ein Murein besitzen[27)-29), 31)-39)], welches sowohl im chemischen Bau als auch in seiner Funktion demjenigen der Gramnegativen ähnlich ist (zur Übersicht s. 12).

Eine Ähnlichkeit im chemischen Aufbau zwischen den von Park et al. aus penicillinbehandelten Zellen von Staph.aur. isolierten Uridindiphosphat-Muramylpeptiden[40), 41)] und den durch Partialhydrolyse von Zellwänden dieser Bakterien gewonnenen Mureinbruchstücken brachte Strominger zu der Ansicht[42)-45)], daß die sich unter Penicillin ansammelnden Nukleotide Vorstufen des Mureins darstellen könnten. Nach dieser Anschauung sammelt sich das Vorstufenmaterial in den penicillinbehandelten Zellen an, da es infolge einer durch das Antibioticum bedingten Hemmung der Mureinsynthese nicht in den Sacculus eingebaut werden kann. So wird die Akkumulation der Uridin-Nukleotide verständlich; unklar jedoch bleibt hierbei der Grund für das Auftreten der morphologischen Veränderungen, welche die Zellen unter dem Einfluß des Penicillins erleiden.

Dieser Effekt des Penicillins wird durch eine von verschiedenen Autoren geäußerte Theorie über das Wachstum des Sacculus[8), 18), 46)-48)] erklärlich. Danach wird die Mureinsynthese durch das aufeinander abgestimmte Zusammenspiel lytischer und synthetisierender Enzyme bewerkstelligt; in

dem geschlossenen Sacculus schaffen lytische Enzyme durch das Lösen kovalenter Bindungen an den Wachstumsstellen Platz für den Einbau neuen Materials. Eine Blockierung des synthetisierenden Systems durch Penicillin hat bei fortdauerndem Wirken der lytischen Enzyme die Lyse des Sacculus zur Folge[8]. Da nun allein der Sacculus für den festen Zusammenhalt der Zellwand verantwortlich ist, zeigt sich das Resultat dieser Lyse in der Entstehung der mechanisch sehr empfindlichen anormalen Zellformen (zur Übersicht s. 49).

Wenn unter Penicillineinfluß in wachsenden Zellen das ursprünglich intakte Murein durch das lytische Enzymsystem abgebaut wird, ohne daß dieser Prozeß parallel dazu durch eine Neusynthese kompensiert wird, müßten die abgespaltenen Murein-Bruchstücke nach einer Hypothese von Weidel entweder in den unter osmotischem Schutz gewonnenen Sphäroplasten oder im umgebenden Medium zu finden sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, solche dem ursprünglichen Murein der Zelle entstammenden Spaltprodukte zu isolieren und soweit wie möglich zu charakterisieren. Als Indikatorsubstanz für Material, welches in Beziehung zum Murein der Bakterienzelle steht, bietet sich die von Work[50] isolierte $\alpha\varepsilon$ -Diaminopimelinsäure (DAP) an. Diese Aminosäure kommt in nicht penicillinbehandelten Bakterien praktisch ausschließlich im Murein des Sacculus vor (zur Übersicht s. 12),51).

Kapitel II

Isolierung DAP- haltiger, löslicher Substanzen aus penicillininduzierten Sphäroplasten von Escherichia coli B

Da die Aufarbeitung des an sich allein schon sehr komplex zusammengesetzen Nährmediums, in welchem die Bakterien mit Penicillin inkubiert wurden, ziemlich aufwendig erschien, wurde zunächst versucht, aus den penicillininduzierten Sphäroplasten selbst lösliche, DAP- haltige Substanzen zu isolieren. Die Inkubation mit dem Antibiotikum wurde solange durchgeführt, bis die ursprünglich stäbchenförmigen Bakterien zu völlig runden Gebilden umgewandelt waren, oder, mit anderen Worten, bis der Sacculus so weitgehend wie möglich zu löslichen Bruchstücken abgebaut war.

Das zur Isolierung niedermolekularer, DAP- haltiger Oligopeptide aus Penicillinsphäroplasten von E. coli führende Arbeitsverfahren sei im Folgenden kurz skizziert: Die abzentrifugierten Sphäroplasten wurden zunächst einer Behandlung in einem Phenol-Wasser-Gemisch unterworfen. In beiden der dabei anfallenden Hauptfraktionen, der Phenol- und der Wasserphase, war DAP nachzuweisen; eine semiquantitative Analyse zeigte, daß die Wasserphase mindestens doppelt soviel DAP enthielt wie die Phenolfraktion. Die Wasserphase wurde nach Entfernung der darin ebenfalls enthaltenen Nukleinsäuren durch Säurefällung weiter aufgearbeitet. Durch die kombinierte Anwendung von Papierelektrophorese und Papierchromatografie gelang es dann schließlich, aus der Vielzahl der in der Wasserphase enthaltenen Komponenten die DAP- haltigen Oligopeptide P1A1; P2A1α ; P2A1β und P3A1α zu isolieren. Dabei wurde nach dem in Abb. 2 wiedergegebenen Arbeitsschema vorgegangen. Die bei der Elektrophorese und Chromatografie anfallenden Fraktionen wurden jeweils mit Wasser vom Papier eluiert, nach Hydrolyse auf DAP geprüft und die DAP- haltigen Komponenten weiter aufgearbeitet.

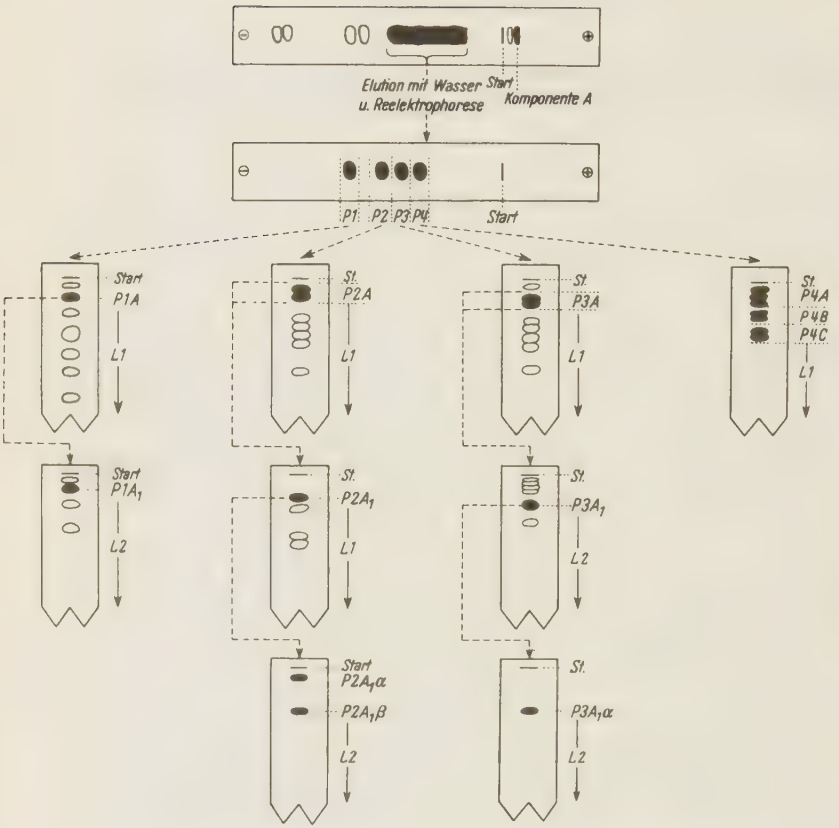


Abb. 2 Schematisierter Arbeitsgang für die Isolierung DAP- haltiger Oligopeptide aus Penicillinsphäroplasten von E. coli B

Die schwarz bezeichneten Flecke stellen die DAP- haltigen Hauptkomponenten dar, welche jeweils weiter aufgearbeitet wurden.

Elution der Komponenten mit Wasser

L1 Papierchromatografie in Lösungsmittelgemisch 1 (s.Kap.II.6)

L2 Papierchromatografie in Lösungsmittelgemisch 2 (s.Kap.II.6)

Material und Methoden

1. Bakterien: Verwendet wurde Escherichia coli Stamm B, wie in (8) beschrieben

2. Nachweis der DAP: Das auf DAP zu untersuchende Material wird in 6nHCl 16 Stunden bei 105° unter Verschluß hydrolysiert (1 ml Salzsäure auf 1 mg Substanz). Nach Eindampfen über Natronkalk Auftragen des Hydrolysats auf parallel zur Faser geschnittene Keilstreifen[52), 53)] von Whatman I Papier (Auftragestelle 1 cm breit, Verbreiterung des Streifens auf 3 cm, Streifenlänge 45 cm; auf einen Streifen können im Bedarfsfalle bis zu 10 mg Substanz aufgetragen werden). Chromatografie absteigend 24 Stunden lang im Lösungsmittelsystem nach Rhuland et al.[54)]. Nach 3 Stunden Trocknen im Abzug werden die Streifen 5 Min. auf 90° erhitzt und dann durch eine 0,2 prozentige Lösung von Ninhydrin in Azeton (g/v) gezogen. Die Chromatogramme werden nun 5 Minuten auf 90° erwärmt, wobei sich die DAP olivgrün anfärbt. Die DAP- Flecke werden nach einiger Zeit leuchtend gelb. Als Vergleichssubstanz wurde ein Gemisch von meso- und LL-DAP der Firma Calbiochem, Los Angeles, verwendet.

3. Gewinnung von Penicillinsphäroplasten:

Sphäroplasten von Escherichia coli Stamm B wurden mit geringen Abänderungen nach der von Lederberg angegebenen Methode[2)] hergestellt. 300 ml Difco Penassay-Medium (M3) in einem 2 l Erlenmeyerkolben wurden mit 1,5 ml einer Übernachtkultur in demselben Medium angeimpft und bei 37° über Nacht auf dem Schütteltisch unter kräftigem Schütteln inkubiert. Zelldichte am folgenden Morgen, mit Zählkammer (Petroff-Hauser) bestimmt, etwa 6 x 10^9. Diese Zellsuspension wurde zu 1 l auf 37° vorgewärmtem Penicillinmedium gegeben (200 g Rohrzucker, Handelsware, werden mit M3 auf 1 l aufgefüllt; Zusatz von 2 g $MgSO_4 + 7H_2O$ und 1 000 000 E Penicillin G "Hoechst"). Dann wurde der Ansatz auf 4 Penicillinkolben (4000 ml Schott u. Gen) verteilt und unter sanftem Schütteln bei 37° im Wärmeraum inkubiert und die Sphäroplastenbildung mit dem Phasenkontrastmikroskop kon-

trolliert. Nach 90 - 120 Minuten waren praktisch keine unveränderten Zellen mehr festzustellen. Die Ausbeute an Sphäroplasten betrug nur etwa 70 - 80 % der eingesetzten Bakterien, bestimmt mit Hilfe der Zählkammer, weil im Laufe der Penicillininkubation etwa 20 - 30 % der entstehenden Sphäroplasten platzen. Der Anteil an nicht veränderten, stäbchenförmigen Bakterien war praktisch zu vernachlässigen. Die Sphäroplastensuspension wurde 45 Minuten bei 0° C und 4800 x g in 4 Bechern abzentrifugiert und jedes der 4 Sedimente nach dreimaligem vorsichtigem Abspülen mit je 50 ml Eiswasser bei -20° C eingefroren.

4. Aufarbeitung der Sphäroplasten

Nach dem Auftauen der eingefrorenen Sphäroplastensedimente erfolgt die weitere Aufarbeitung im Kühlraum bei 4° C. Die Sedimente werden vereinigt, in 7 ml Eiswasser resuspendiert und nach Zusatz von 1 ml 5 % (g/v) Na-Desoxycholatlösung (Dr. Th. Schuchardt GmbH & Co.) mit dem Spatel kräftig durchgearbeitet, wobei die zähe Masse glasig durchsichtig wird. Nach Zusatz einer dem Volumen des Ansatzes entsprechenden Menge in der Kälte wassergesättigten Phenols wird solange kräftig geschüttelt, bis eine homogene Suspension entsteht. Diese wird 20' bei 2800xg zentrifugiert. Im Zentrifugenglas bildet sich ein gelbliches, zähes Sediment; darüber befinden sich die klare, gelbe Phenolphase und die milchige Wasserphase.

Das glasige Sediment und die Phenolphase werden mit einer Kapillarpipette abgesaugt; die Phenolextraktion der Wasserphase wird noch zweimal wiederholt. Durch Ausschütteln mit peroxydfreiem Äther wird die Wasserphase vom Phenol befreit und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Nach Abdampfen des Äthers durch Einblasen von Stickstoff wird sedimentierbares Material 30 Minuten bei 17 300xg abgeschleudert und das Sediment zweimal mit Wasser gewaschen. Die Überstände werden vereinigt und auf 100 ml aufgefüllt. Unter kräftigem Rühren wird nun eine Lösung von 0,6 ml Eisessig in 5 ml Wasser tropfenweise zugefügt. Dabei fällt ein voluminöser Niederschlag aus, welcher nach 2 Stunden Stehenlassen 30

Minuten bei 17300 xg abzentrifugiert wird. Das Sediment wird zweimal mit Wasser gewaschen, die vereinigten Überstände werden im Rotationsverdampfer bei 20° Wasserbadtemperatur eingedampft. Dabei eventuell noch ausfallendes Material wird, wie oben angegeben, abzentrifugiert, der Überstand auf etwa 5 ml eingeengt und lyophilisiert; die Ausbeute beträgt etwa 280-300 mg. Diese im Folgenden mit R bezeichnete Fraktion enthält DAP. Die weitere Auftrennung von R erfolgt durch Papierelektrophorese.

5. Papierelektrophorese zur präparativen Auftrennung von R

Zur Elektrophorese wurde eine nach Katz et al.[55] gebaute Apparatur mit 2 m Essigsäure als Elektrolytflüssigkeit verwendet. 100-150 mg R wurden auf eine Länge von 51 cm auf Macherey-Nagel-Papier 2214 (MN 2214) quer zur Faserrichtung, 15 cm von Ende des Bogens entfernt, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über eine Bogenlänge von 56 cm aufsteigend zur Kathode 4 Stunden mit 21,4 V/cm in 2m Essigsäure. Die Anfärbung eines Kontrollstreifens mit Ninhydrin zeigte dann, daß außer 2 etwa 1-3 cm weit zur Anode gelaufenen schwach ausgebildeten Banden das Hauptmaterial in Richtung Kathode gewandert war. Die Auftrennung war infolge des von der Herstellung der Sphäroplasten mitgeschleppten Rohrzukkers nicht allzu gut. Das Pherogramm wurde willkürlich in einzelne Zonen unterteilt, diese wurden ausgeschnitten, das Papier zerkleinert und mit Wasser eluiert. Aliquots der Eluate wurden nach Hydrolyse auf die Anwesenheit von DAP überprüft. Dabei zeigte sich, daß in den etwa 5-15 cm weit zur Kathode gelaufenen Komponenten und in den gemeinsam eluierten, zur Anode gewanderten Substanzen, DAP nachzuweisen war.

Die Hauptmenge der zur Kathode gelaufenen, DAP- haltigen Eluate wurde im Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und der Eluatrückstand zur Reelektrophorese anschließend auf insgesamt 13 Elektrophoresebogen (s.o.) aufgetragen.

Die Reelektrophorese wurde ebenfalls in 2 m Essigsäure 4 1/2 Stunden mit 27 V/cm vorgenommen. Die Pherogramme wurden nun nach Trocknen über Nacht im Abzug anschließend 10 Minuten auf 90°C im Umwältrockenschrank erwärmt und die unter UV-Licht (Q 500, Quarzlampen Ges.m.b.H. Hanau) sichtbaren Banden angezeichnet. Ein Vergleich dieser Banden mit den durch Ninhydrin auf einem 1 cm breiten Kontrollstreifen sichtbar gemachten Zonen ergab in diesem wie in den später beschriebenen Fällen, daß die ninhydrinpositiven Komponenten immer auch ohne vorherige Anfärbung mit Ninhydrin unter UV lokalisiert werden konnten. Unter den geschilderten Elektrophoresebedingungen legte die am weitesten zur Kathode wandernde Bande, als P1 bezeichnet, eine Laufstrecke von etwa 20 cm zurück; dann folgten die Banden P2, P3 und P4 mit 16, 14 und 11,5 cm Laufstrecke. In jeder der für sich wiederum mit Wasser eluierten Banden P1 - P4 konnte DAP nachgewiesen werden. Die weitere Reinigung der Komponenten P1 - P4 erfolgte durch Papierchromatografie.

6. Papierchromatografische Auftrennung von P1-P4

Die Chromatografie wurde absteigend auf den Chromatografiepapieren MN 2214 und Whatman N° I durchgeführt. Es wurden zwei Lösungsmittelgemische verwendet.

1. die organische Phase des zweiphasigen Gemisches Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5; v:v:v) und
2. Pyridin-Wasser (4:1; v:v).

P1

P1 wurde auf 3 x 32 cm MN 2214 quer zur Faser aufgetragen. Chromatografie in Lösungsmittelgemisch 1. 14 Stunden lang. Nach Trocknen der Chromatogramme Anzeichnen der Banden unter UV- Licht und Anfärben eines 1/2 cm breiten Kontrollstreifens, wie bei Elektrophorese beschrieben.

Dabei traten zwei ninhydrinpositive Hauptbanden auf mit einer Laufstrecke 4 cm (P1A) und 6 cm. P1A enthielt den überwiegenden Anteil an DAP, wie sich nach Elution mit Wasser ergab. Auswaage des Eluatrückstandes von P1A 5,8 mg.

Nach Vorversuchen wurden für die Endreinigung von P1A 1,9 mg auf 20 cm Whatman I Papier quer zur Faser aufgetragen. Chromatografie in Lösungsmittel 2.16 Stunden. Nach 3 Stunden Trocknen des Chromatogramms Anzeichnen der Banden unter UV und Anfärben eines 3 mm breiten Kontrollstreifens. Es traten 4 ninhydrinpositive Zonen auf, von denen jedoch nur eine deutlich hervortritt. Diese etwa 2 cm weit gelaufene Substanz (P1A1) enthielt DAP, wie sich nach Elution der Banden mit Wasser ergab.

P2

Auftragen von P2 auf 2 x 32 cm MN 2214 quer zur Faser; Chromatografie in System 1. 14 Stunden. Anzeichnen unter UV und Anfärben der Banden wie bei P1 beschrieben. Auftrennung von P2 in 7 ninhydrinpositive Komponenten. Die Banden wurden mit Wasser vom Papier eluiert und die eingedampften Eluate nach Hydrolyse auf DAP geprüft. Dabei war nur in einer 2-6 cm weit gelaufenen Zone DAP nachweisbar (P2A). Nach Auftragen von P2A auf 32 cm MN 2214 quer zur Faser Rechromatografie in Lösungsmittel 1. 24 Stunden und anschließend nach zwölfstündigem Trocknen des Chromatogramms im Abzug Fortsetzung der Chromatografie unter den obigen Bedingungen. Dabei Auftrennung in 4 Banden. Nach Elution derselben mit Wasser war nur in der 6,5 - 9 cm weit gelaufenen Zone DAP nachzuweisen (P2A1). Auswaage nach Elution dieser Bande mit Wasser und Eindampfen im Rotationsverdampfer 2,9 mg.

Von P2A1 wurden 2,7 mg auf 32 cm Whatman I aufgetragen und in System 2. 30 Stunden chromatografiert. Unter UV und mit Ninhydrin2Banden (P2A1α ; P2A1ß) feststellbar; beide enthielten DAP. Unter den angegebenen Bedingungen lief P2A1α 2 cm und P2A1ß 8 cm weit.

P3

Das auf 2x 32 cm aufgetragene Material trennt sich nach 14 Stunden Chromatografie auf MN 2214 quer zur Faser in System 1. in 8 ninhydrinpositive Zonen auf, von denen eine

2-6 cm weit laufende Bande DAP enthält (P3A). Auftragen des gesamten mit Wasser eluierten Materials P3A auf 2x 32 cm Whatman I Papier quer zur Faser. Chromatografie 30 Stunden in System 2. Auftrennung in 6 ninhydrinpositive Komponenten, von denen die die DAP enthaltende Substanz eine 4,5 - 7,5 cm weit gelaufene Zone bildet. Elution dieses Materials (s.o.) und nochmalige Rechromatografie unter den zuletzt angegebenen Bedingungen 39 Stunden. Eine weitere Auftrennung ist dabei nicht festzustellen. Elution der Substanz (P3A1α.) mit Wasser.

P4

Bei der chromatografischen Auftrennung von P4 ließ sich das vorhandene Material in mehrere DAP- haltige Komponenten auftrennen. Weitergehende Reinigungsversuche wurden nicht unternommen, da nur eine unzureichende Menge Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand.

7. Dintrophenylierung der DAP- haltigen Komponenten P1A1; P2A1α ; P2A1ß und P3A1α ; qualitative und quantitative Analyse

Eine 5-10μg DAP enthaltende Menge der zu untersuchenden Substanz wurde in ein 5 ml Schliffröhrchen überführt und in 0,02 ml einer 1 prozentigen (g/l)$NaHCO_3$ Lösung aufgenommen. Zusatz von 0,05 ml einer 0,2 prozentigen (ml/ml) Lösung von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol in absolutem Äthanol. Nach Durchmischen des Ansatzes 12 Stunden Stehenlassen im Dunkeln bei 37° C. Verdünnen mit 1 ml Wasser, 3 mal Ausschütteln mit je 2 ml Äther. Dann nach Ansäuern mit 0,02 ml 4 n Salzsäure weiteres dreimaliges Ausschütteln mit ebenfalls je 2 ml Äther. Die Wasserphase und die vereinigten, nach Ansäuern erhaltenen Ätherphasen, wurden eingedampft und in je 0,5 ml Salzsäure 14 Stunden bei 100° hydrolysiert. Dann wurden die Hydrolysate auf die in (20) angegebene Weise chromatografiert; zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der einzelnen Komponenten[20] wurden nicht mit Dinitrofluorbenzol umgesetzte, hydroly-

sierte Proben der DAP- haltigen Substanzen mit aufgetragen. Auf die Behandlung der Chromatogramme im Exsikkator wurde verzichtet. Statt dessen lief stets eine Bezugssubstanz von bekanntem Molverhältnis der einzelnen Komponenten mit, und zwar hochgereinigtes C5[20), 22)].

8. Aufarbeitung des bei Elektrophorese von R zur Anode laufenden DAP- haltigen Materials (A)

Unter UV- Licht sind, bei gut aufgetrennten Pherogrammen von R,3 zur Anode wandernde Banden feststellbar, von denen zwei ninhydrinpositiv sind. Die am weitesten zur Anode (2-3 cm) laufende ninhydrinpositive Komponente enthält DAP. Nach Elution dieser Bande von 3 Elektrophoresebogen mit Wasser wurden 3,4 mg des eingedampften Eluats A, entsprechend 1/3 der Gesamtauswaage, in 4n HCl 14 Stunden bei 100° C hydrolysiert. Vom Hydrolysat wurde ein zweidimensionales Papierchromatogramm angefertigt (s. Kap. II.9).

9. Zweidimensionale Papierchromatografie von A

Es wurde die von Pfennig beschriebene Methode[56)] angewendet. Die Substanz wurde auf 35 x 43 cm große Bogen MN 2214 Papier aufgetragen. Als Lösungsmittel fanden die Gemische Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1; v:v:v) in der ersten Laufrichtung, und α-Picolin-Essigsäure-Wasser (75:2:23; v:v:v) in der zweiten Laufrichtung Anwendung.

10. Ultraviolett-Spektrum von A

Zwischen 220 und 325 mμ wurde das UV-Spektrum der Substanz mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer RPQ 20 A von Zeiss aufgenommen. Es wurden Lösungen von A in 0,01 n NaOH und 0,01 n HCl gemessen; in der Vergleichsküvette befand sich ein Eluat von blankem Elektrophoresepapier.

11. Nachweis von Uracil in A

45 μg A wurden in 1 ml 6n HCl unter CO_2 nach Hershey[57)] hydrolysiert. Die eindimensionale Chromatografie erfolgte

nach Smith et al.[58] auf Whatman III Papier mit Butanol-Wasser (84:14; v:v).

Ergebnisse und Diskussion

Die aus Penicillinsphäroplasten gewonnenen und soweit wie möglich durch Elektrophorese und Papierchromatografie gereinigten Komponenten P1A1, P2A1α , P2A1ß und P3A1α stellen Oligopeptide dar. Die Substanz P1A1 erwies sich als chromatografisch rein, während die übrigen Komponenten noch Verunreinigungen enthielten. Auf eine weitere Reinigung dieser Peptide mußte verzichtet werden, da zu wenig Substanz zur Verfügung stand.

Die Komponenten P1A1, P2A1ß und P3A1α enthalten die Aminosäuren Glu; DAP und Ala, das Peptid P2A1α ist aus Glu und DAP aufgebaut. Setzt man DAP = 1, ergibt sich für die chromatografisch reine Substanz P1A1 folgende molare Zusammensetzung: DAP = 1; Glu = 1 (04), Ala = 2 (02). Für die weiteren, nicht reinen Peptide wurden folgende Molverhältnisse ermittelt:

P2A1α ; DAP = 1; Glu = 1,2
P2A1ß ; DAP = 1; Glu = 1 , Ala = 1,7
P3A1α ; DAP = 1; Glu = 1,4; Ala = 1,4

Sehr wahrscheinlich sind die in diesen Substanzen noch enthaltenen ninhydrinpositiven Verunreinigungen für die sich ergebenden nicht geradzahligen Molverhältnisse verantwortlich.

Nach Dinitrophenylierung bleibt das Reaktionsprodukt bei Substanz P1A1 in der wässerigen Phase. Die gesamte DAP ist mono-dinitrophenyliert, vom Alanin die Hälfte umgesetzt

und die Glutaminsäure unverändert; also ist 1 Mol Alanin aminoendständig und eine Aminogruppe der DAP frei.

Das Peptid P2A1α liefert ein ätherlösliches Reaktionsprodukt; die gesamte DAP ist mono-dinitrophenyliert, die Glutaminsäure völlig umgesetzt, muß also aminoendständig sein. Die beiden Aminosäuren sind dementsprechend folgendermaßen angeordnet: H_2N-Glu-DAP-COOH.

Bei den Peptiden P2A1ß und P3A1α geht das dinitrophenylierte Material in die ätherische Phase über; beide Substanzen liefern dasselbe Bild. Die DAP ist mono-dinitrophenyliert, die Glutaminsäure ebenfalls umgesetzt, Alanin bleibt unverändert. Die beiden Peptide scheinen ein und dieselbe Substanz darzustellen mit folgender Anordnung der Aminosäuren: H_2N-Glu-DAP-Ala-COOH. Für die Identität der beiden Peptide spricht einmal deren gleiches Verhalten bei der Papierchromatografie (s. Abb. 2); ferner muß bedacht werden, daß das Tripeptid Glu-DAP-Ala bei der Papierelektrophorese durchaus zwischen den beiden Banden P2 und P3 lokalisiert sein, jedoch infolge seiner nur geringen Menge weder unter UV noch mit Ninhydrin isoliert sichtbar gemacht werden kann, sodaß es bei der Elution von P2 und P3 auf beide Fraktionen verteilt werden würde. In der Komponente P3A1α ist ein geringer Teil der Glutaminsäure nicht umgesetzt; dies könnte das zusätzliche Vorkommen eines Peptids mit der Sequenz H_2N-Ala-Glu-DAP-COOH bedeuten. Die Dinitrophenylierbarkeit jeweils einer der zwei in DAP enthaltenen Aminogruppen zeigt, daß die isolierten Oligopeptide in monomerer Form auftreten, also keine Verknüpfung zweier Peptidketten entsprechend dem Aufbau von C3 (s. Abb. 1) vorliegt.

Die beschriebenen Peptide sind als Produkte einer Partialhydrolyse von Substanz P1A1 durch zelleigene Enzyme einleuchtend zu interpretieren und diese wiederum als der vom Muropeptid C6 abhydrolysierte Peptidanteil (s. Abb. 1). Die durch Dinitrophenylierung soweit wie möglich bestimmten und durch vorstehende Überlegungen ergänzten Sequenzen der Peptide seien noch einmal bildlich wiedergegeben:

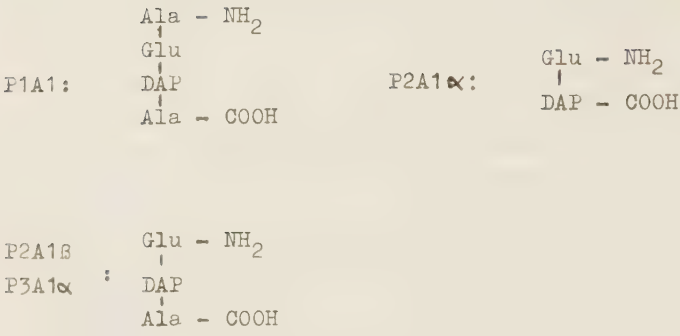


Abb. 3 Struktur der aus Penicillinsphäroplasten isolierten, DAP- haltigen Oligopeptide

Muropeptid - abbauende Enzyme, die für die Entstehung der beschriebenen Peptide verantwortlich gemacht werden können, kommen tatsächlich in E. coli B vor und wurden daraus isoliert[59), 60)]. So sprengt eine Muramylamidase im Muropeptid C6 die Amidbindung zwischen der Muraminsäure und dem Alanin der Peptidseitenkette, wobei das Peptid P1A1 als Stammsubstanz der übrigen freigesetzt würde. Eine Aminopeptidase kann daraus ein Tripeptid vom Aufbau der Substanz P2A1ß bzw. P3A1α entstehen lassen. Dieses würdedann unter dem Einfluß einer auch schon bekannten Alanincarboxypeptidase ein Dipeptid von der Struktur der Substanz P2A1α ergeben (s. Abb. 3). Weitere Mureinspaltprodukte wären durch die gleichzeitige Abspaltung der über eine Peptidbindung miteinander verbundenen Peptidseitenketten von C3-Molekülen und deren Abbau durch die schon oben erwähnten Enzyme zu erwarten. Vielleicht sind solche Peptide in den noch nicht näher charakterisierten, DAP- haltigen Fraktionen von P4 enthalten. Solche Peptide würden durch ein ebenfalls bekanntes Enzym, das die Bindung zwischen zwei C6-Peptidseitenketten hydrolysiert, in die schon beschriebenen Abbauprodukte von C6 übergehen.

So liefern also die bisher aufgeführten Befunde neue Hinweise darauf, daß in der Bakterienzelle tatsächlich ein

System von Enzymen wirkt, welche in der Lage sind, das Murein der Zelle durchgreifend abzubauen und deren lytischer Effekt unter Penicillin infolge einer Blockierung der Mureinsynthese nicht durch den Einbau neuen Materials kompensiert werden kann.

Wie aus dem Folgenden hervorgeht, ließ sich ferner zeigen, daß aus den penicillininduzierten Sphäroplasten auch Uridindiphosphat-Muramylpeptide isoliert werden können, welche als Vorprodukte für die Zellwandsynthese angesehen werden (s. Einleitung).

Die bei der Papierelektrophorese von R zur Anode wandernde Substanz A zeigt ein UV Spektrum, welches mit dem von Strominger für Uridinnukleotide angegebenen[61] im wesentlichen übereinstimmt. In 0,01n NaOH wurde für Q 250/260 ein Wert von 0,83 (Strominger 0,83) und für Q 280/260 von 0,33 (Strominger 0,37) ermittelt. In 0,01n HCl ergaben sich folgende Werte: Q250/260 = 0,86 (Strominger 0,77) und Q280/260 0,38 (Strominger 0,38). Die leichte Differenz zwischen den von Strominger ermittelten und den für A gemessenen Werten hat wohl ihren Grund in einer geringen Verunreinigung von A.

Nach Hydrolyse von A ließ sich Uracil chromatografisch nachweisen; ferner konnten auf zweidimensionalen Chromatogrammen die Mureinbausteine Muraminsäure, DAP, Glu und Ala eindeutig festgestellt werden. Die Menge des in den Sphäroplasten enthaltenen Materials A schwankte von Versuch zu Versuch beträchtlich, in manchen Ansätzen war A nicht eindeutig nachzuweisen.

Da nun das Auftreten der beschriebenen Peptide auch durch eine enzymatische Partialhydrolyse von sich unter Penicillin ansammelnden Mureinvorstufen erklärt werden könnte, fehlt doch noch der direkte Beweis, daß die Substanzen P1A1, P2A1α , P2A1ß + P3A1α tatsächlich dem schon vor der Einwirkung von Penicillin in der Zelle vorhandenen intaktem Sacculus entstammen. Um also eindeutig festzustellen, ob die DAP- haltigen Oligopeptide Bruchstücke des ursprüngli-

chen Mureins, Fragmente von sich ansammelnden Uridinnukleotiden oder eine Mischung von Hydrolyseprodukten des Sacculus und der Vorstufen darstellen, wurden Versuche unter Anwendung der Isotopentechnik durchgeführt.

Kapitel III

Versuche zur Aufklärung des Ursprungs der DAP- haltigen Oligopeptide unter Anwendung der Isotopentechnik

Das Murein von E. coli B wurde mit 2-^{14}C-DAP radiomarkiert. In ^{14}C-DAP-freiem Medium wurden solche Bakterien anschließend mit Penicillin inkubiert und aus den Sphäroplasten die Komponenten P1-P4 isoliert. Ein Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten der DAP in P1-P4 und der DAP aus dem Murein vor Zugabe des Antibiotikums (Nullprobe) sollte etwas über den Ursprung der beschriebenen Peptide P1A1 - P3A1α aussagen. Sind die spezifischen Radioaktivitäten der DAP in der Nullprobe und der Komponenten P1-P4 nur wenig voneinander verschieden, müssen die DAP- haltigen Peptide dem ursprünglichen Murein der Zellen entstammen. Ist die spezifische Aktivität der Peptid-DAP sehr gering oder gleich null, können P1A1 - P3A1α erst während der Penicillineinwirkung synthetisiert worden sein. Die dritte Möglichkeit, nämlich eine spezifische Radioaktivität der DAP in P1-P4, welche zwar geringer als die der DAP aus der Nullprobe ist, jedoch einen Wert deutlich größer als null aufweist, läßt darauf schließen, daß P1A1 - P3A1α eine Mischung von Abbauprodukten des Sacculus und akkumulierter Mureinvorstufen darstellen.

Material und Methoden

1. Bakterien: Wie in Kap. II. beschrieben.

2. Radiomarkierung der Bakterien und Gewinnung von ^{14}C-DAP-markierten Penicillinsphäroplasten

Verwendet wurde DAP-2^{14}C von Calbiochem, Los Angeles, USA, Lot 880 187 mit einer spez. Aktivität von 8,3 mc/mM. In 60 ml Difco M3 werden 7,5μc 2-^{14}C-DAP gelöst und in einem 2 l Erlenmeyerkolben nach Sterilisation (15 Min. bei 120°; 1 Atü) mit 0,3 ml einer Bakterienübernachtkultur angeimpft. Die Bakteriensuspension wird 9 Stunden bei 37° auf der

Schüttelmaschine inkubiert und dann mit sterilem M3 auf 300 ml aufgefüllt (Endkonzentration an 2-^{14}C-DAP 0,025µc / 1 ml). Die Inkubation wird über Nacht fortgesetzt und die Bakteriensuspension dann 10 Minuten bei 14600xg und 0° C abzentrifugiert. Nach zweimaligem vorsichtigem Abspülen der Sedimente mit ^{14}C-DAP- freiem M3 werden die Bakterien in 300 ml auf 37° vorgewärmtem M3 resuspendiert und zu 1 l Penicillinmedium (s. Kap. II) gegeben. Die Herstellung der Sphäroplasten erfolgt wie in Kap.II beschrieben.

3. Aufarbeitung der vor Beginn der Inkubation mit Penicillin entnommenen Bakteriensuspension

Vor Beginn der Inkubation der Zellen im Penicillinmedium werden 100 ml Suspension entnommen und sofort abzentrifugiert (30 Minuten bei 14 600xg; 0° C). Die Sedimente werden 2 mal mit je 100 ml Hershey Puffer (HP;[62]) gewaschen (s. o.) und dann bei -20° C eingefroren. Nach vorsichtigem Auftauen werden die Bakterien in 10 ml Wasser resuspendiert und langsam 10 ml 4 prozentiger Na-Dodecylsulfatlösung (g/v) zugefügt. Nach Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur wird die hochviskose Lösung mit Wasser auf 60 ml verdünnt und abzentrifugiert (45 Minuten bei 39 000 xg). Das Sediment wird 5 mal mit Wasser gewaschen, lyophilisiert und ausgewogen.

4. Aufarbeitung der Sphäroplasten: Wie in Kap.II beschrieben.

5. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der DAP

a) Isolierung der DAP

Das Untersuchungsmaterial wird hydrolysiert und chromatografiert, wie in Kap.II angegeben. Die im Lösungsmittelsystem nach Rhuland et al.[54] entwickelten Streifen werden nach 3 Stunden Trocknen im Abzug in dem System α-Picolin-Eisessig-Wasser (75:2:23; v:v:v) bis zum Abtropfen nochmals chromatografiert. In diesem Lösungsmittelgemisch läuft die DAP sehr langsam, Verunreinigungen, vor allem bei der Hydrolyse entstehende Humine, wandern auf dem Streifen voraus.

Nach 6 Stunden Trocknen im Abzug wird ein Kontrollstreifen, auf welchem ebenfalls Hydrolysat der zu analysierenden Substanz aufgetragen worden war, mit Ninhydrin angefärbt, die DAP- haltige Zone auf den Chromatogrammen angezeichnet und ausgeschnitten. Die DAP wird durch 6 malige Extraktion des kleingeschnittenen Papiers mit jeweils 10 ml Wasser eluiert, das Eluat im Rotationsverdampfer eingeengt und dann lyophilisiert. Aliquots der Eluate, etwa 10-20 µg DAP enthaltend, werden auf 1 cm Whatman III Papier aufgetragen und der Elektrophorese unterworfen (s. Kap. II; 2 m Essigsäure, 54 V/cm; 2 Stunden). Nach Trocknen im Abzug werden die DAP- Flecke unter UV- Licht angezeichnet (s. Kap. II). Durch die Elektrophorese wird die DAP von Cystin und anderen Verunreinigungen einwandfrei abgetrennt. Die DAP- Flecke werden als Scheibchen mit 2,3 cm Durchmesser ausgeschnitten; sind etwa 10-15 µg DAP auf 1 cm Papier aufgetragen, wird auf diese Weise die gesamte eingesetzte DAP- Menge erfaßt, wie eine Anfärbung der Elektropherogramme mit Ninhydrin nach dem Ausschneiden der DAP- Flecke ergab. Die Radioaktivität der ausgeschnittenen Scheibchen wird direkt gemessen; innerhalb einer Versuchsreihe werden sämtliche Proben gleich behandelt.

b) Messung der Radioaktivität

Die Proben wurden im TRI-CARB Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell 315 EX, gemessen. Die trockenen Papierscheibchen wurden direkt in Probegläschen überführt[63] und mit 5 ml Szintillatorlösung (4 g PPO* und 0,1 g POPOP "Packard" in 1 l Toluol p.A. gelöst) übergossen.

Zur Zählung der Aktivität wurden die für jedes Gerät individuell zu bestimmenden Arbeitsbedingungen ermittelt. Es wurde darauf geachtet, daß die angelegte Hochspannung und die Einstellung des Zählfensters so aufeinander abgestimmt waren, daß das Maximum der Pulsenergie in der Mitte des eingestellten Fensters lag (balance point) und daß der Quo-

---

* PPO = 2,5-Diphenyloxazol
POPOP = 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzol.

tient $\frac{S^2}{B}$ (S = Zahl der für eine Probe gezählten Jpm korrigiert gegen Blindwert; B = Blindwert) den höchstmöglichen Wert erreichte. Eine bei dieser Einstellung (Hochspannung etwa 855 V; Koinzidenzschaltung; Fenster weit; Discriminator A = 100; B = 820; Ausbeute 100) ermittelte Eichkurve für 2-^{14}C-DAP geht durch den Nullpunkt und zeigt eine lineare Korrelation zwischen Zählausbeute und der auf Papierscheibchen aufgetragenen Menge an radioaktiver DAP; "quenching" ist weitgehend ausgeschaltet[64]. Die Zählausbeute beträgt 57 %; sie wurde, da kein 2-^{14}C-DAP-Standardpräparat zur Herstellung eines inneren Standards zur Verfügung stand, mit Hilfe eines ^{14}C-Toluol-Standardpräparats bestimmt. Von jeder Probe wurden mindestens 5mal je 1000 Impulse gezählt, die Werte wurden gegen den Blindwert (etwa 27 Ipm) korrigiert.

c) Bestimmung der DAP

Die im Szintillationszähler gemessenen Papierscheibchen werden zur Entfernung des Szintillators 3 mal mit je 10 ml Toluol gewaschen, getrocknet und in 8 Sektoren zerschnitten. Nach Überführen des Papiers in Schliffröhrchen wird zu jeder Probe 1 ml eines Gemisches Eisessig-Wasser 1+1 (v+v) zugefügt; nach 30 Minuten werden 0,5 ml der sauren Ninhydrinlösung nach Work[65] einpipettiert und die Probe 5 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt. Der Lösung werden nach schnellem Abkühlen in Eiswasser 2 ml Eisessig zugefügt; 30 Minuten später wird das Papier über ein Mikrofilter abfiltriert und die Extinktion der Lösung gegen eine den Probenlösungen genau entsprechend hergestellte DAP- freie Vergleichslösung gemessen.

Die Extinktion bei 440 mμ wurde im Spektralphotometer DU von Beckman bestimmt, Lichtweg 1 cm. Die Absolutwerte wurden einer Eichkurve entnommen, welche unter den obigen Bedingungen (angefangen mit der Elektrophorese der DAP-Proben) hergestellt wurde (Eichsubstanz s. Kap.II).

6. Bestimmung der in ^{14}C-DAP-markierten Bakterien enthaltenen Menge löslicher DAP (pool)

Die Radiomarkierung der Bakterien wurde wie oben angegeben vorgenommen. 300 ml einer ^{14}C- Zellsuspension wurden, wie bei der Herstellung der ^{14}C-Sphäroplasten schon beschrieben, abzentrifugiert, das Sediment 2 mal mit HP vorsichtig abgespült und dann in 50 ml HP resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 3 Aliquots entnommen und jeweils getrennt aufgearbeitet. Eine Probe blieb unbehandelt, von den beiden anderen wurde die eine mit Na-Dodecylsulfatlösung, die andere mit Trichloressigsäurelösung versetzt, um die in den Zellen enthaltene, in löslicher Form vorliegende DAP zu extrahieren. Danach wurde die Gesamtmenge der pro Aliquot enthaltenen DAP bestimmt.

x) Unbehandelte Probe: Die Bakteriensuspension wurde bei 0° C 30 Minuten bei 39 000xg abzentrifugiert, lyophilisiert und ausgewogen.

y) Mit Na-Dodecylsulfatlösung versetzte Probe: Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. III,3 beschrieben.

z) Mit Trichloressigsäure extrahierte Probe: Die Suspension wurde wie bei x) abzentrifugiert, das Sediment in 10 ml Wasser resuspendiert und 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf 0° wurde 1 ml 50-prozentiger (g/v) Trichloressigsäure (TCS)-Lösung zugesetzt und der Ansatz 6 Stunden bei 4° C belassen. Die Lösung wurde dann 20 Minuten bei 2800 xg abzentrifugiert, das Sediment in 10 ml 5 prozentiger TCS- Lösung resuspendiert und über Nacht nochmals bei 4° C stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren (s.o.) wurde dann das Sediment lyophilisiert und ausgewogen.

Von den TCS- Überständen werden je 0,1 ml auf ein Whatman III Papierscheibchen Ø 2,3 cm aufgetragen und die Radioaktivität gemessen, um festzustellen, ob die Extraktion des löslichen ^{14}C- enthaltenden Materials quantitativ erfolgt war.

Von den entsprechend x-z erhaltenen Sedimenten wurden bei x und z jeweils etwa 10 mg, von y etwa 5 mg genau gewogen und hydrolysiert, wie in Kap.II beschrieben,und von den eingedampften Hydrolysaten jeweils die Hälfte zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität und der absoluten Menge der DAP eingesetzt (s. Kap.III,5a-c). Die ermittelten Werte wurden auf die Auswaagen der einzelnen Sedimente umgerechnet.

7. Gewinnung von Sphäroplastenmembranen durch Lyse von Penicillinsphäroplasten. Bestimmung der Absolutmenge und der spezifischen Radioaktivität der in den Membranen enthaltenen DAP

a) Darstellung der Sphäroplastenmembranen (SPM)

Aus einer ^{14}C-Bakteriensuspension in Penicillinmedium (entspr. Kap. III,2) wurden zu Beginn der Inkubation mit Penicillin 100 ml Suspension entnommen, um die Gesamtmenge der im intakten Murein eingebauten DAP zu bestimmen. Die Aufarbeitung dieser Nullkontrolle erfolgte wie in Kap. III,3 beschrieben. Das eingefrorene Sphäroplastensediment von 1160 ml Suspension wurde in 50 ml Desoxyribonuclease- haltigem Eiswasser resuspendiert; dabei lysierten die Sphäroplasten. Nach 30 Minuten wurde die Suspension bei 0° C 30 Minuten bei 39 000xg abzentrifugiert, das Sediment nochmals mit 50 ml D Nase- haltigem Eiswasser gewaschen und dann in 50 ml Eiswasser resuspendiert. Zur Zerstörung autolytischer Enzyme wurde die SPM- Suspension dann in 200 ml kochendes Wasser eingerührt und 10 Minuten aufgekocht. Nach Abzentrifugieren (45 Minuten bei 14 600 xg) wurde dann das Sediment in 20 ml Wasser resuspendiert und durch fünfmaliges differentielles Zentrifugieren (je 10 Minuten bei 1000 xg) in 2 Fraktionen unterteilt, von denen die Hauptfraktion nahezu ausschließlich SPM, die Nebenfraktion auch Bakterien enthielt, welche nicht in Sphäroplasten umgewandelt worden waren (Kontrolle mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops). Beide Fraktionen wurden für sich lyophilisiert und ausgewogen.

b) Die Bestimmung der absoluten Menge und der spezifischen Radioaktivität der DAP in SPM und in der vor Beginn der Inkubation mit Penicillin entnommenen Probe wurde, wie in Kap. III,5a-c geschildert, durchgeführt.

8. Aufarbeitung der bei der Lyse von Penicillinsphäroplasten anfallenden Überstände

Die bei der Lyse der Sphäroplasten und nach dem Aufkochen von SPM erhaltenen Überstände (s. 7a) wurden vereinigt und nach Zugabe von 10 ml wassergesättigtem Phenol am Rotationsverdampfer auf etwa 25 ml eingeengt. Die Wasserphase wurde nun wie angegeben (Kap. II,4) mit Phenol extrahiert, lyophilisiert und ausgewogen.

Ergebnisse und Diskussion

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche sollten zusätzlich zu den Aussagen über die Herkunft der DAP- haltigen Oligopeptide P1A1-P3A1α noch weitere Auskünfte liefern. Ein Vergleich der Gesamtmengen an DAP im Murein der Zellen vor Beginn der Penicillinbehandlung und der anschließend in den Sphäroplastenmembranen noch zu findenden DAP sollte etwas über das Ausmaß der Lyse des Sacculus unter Penicillin besagen. Weiterhin sollte es möglich sein, durch einen Vergleich der spezifischen Radioaktivität von DAP des ursprünglichen Mureins und der DAP in den Sphäroplastenmembranen die Hemmung der Mureinsynthese unter dem Einfluß des Antibioticums abzuschätzen.

Zunächst sei ein Teil der unter Anwendung der Isotopentechnik gewonnenen Daten in tabellarischer Form wiedergegeben: Tabelle 1. (s. nächste Seite).

Tabelle 1

Spezifische Radioaktivität der DAP im Murein vor Penicillinbehandlung (Nullprobe), in Sphäroplastenmembranen (SPM) und in den Fraktionen P1 - P4. Die Angabe der spezifischen Radioaktivität (spez. . R) erfolgt in Ipm/10μ g isolierter DAP. Die spezifische Radioaktivität der Nullwerte (s.o.) wurde gleich 100 % gesetzt, die übrigen Werte wurden darauf bezogen. Diese in der mit % bezeichneten Spalte wiedergegebenen Werte sind auf ganze Zahlen auf- bzw. abgerundet. In den Versuchen 1 und 2 wurde die DAP in P2 - P4 gemeinsam bestimmt. Sind bei einer Fraktion mehrere Werte angegeben, handelt es sich um die Ergebnisse verschiedener Bestimmungen.

Versuch Nr.		Null-probe	SPM	P1	P2	P3	P4
1	Spez.R	955, 940	-	160;175	235		
	%	100	-	18	25		
2	Spez.R.	1165, 1175	875	185,180, 185	215, 205		
	%	100	75	16	18		
3	Spez.R.	850, 810	655, 650	-	-	-	-
	%	100	79	-	-	-	-
4	Spez.R.	840, 840	635	310	128,129	170, 180	230
	%	100	76	37	15	21	27

Aus den angegebenen Werten ergibt sich klar, daß das in P1-P4 vorkommende DAP- haltige Peptidmaterial nicht ausschließlich dem ursprünglichen Murein der Zellen vor Penicillininkubation entstammen kann. Da die spezifische Radioaktivität der DAP in P1-P4 nur etwa 20-30 % des Nullwertes beträgt, muß auf jeden Fall eine Verdünnung des eventuell vom Murein abgespaltenen Materials durch chemisch identische, jedoch erst im Verlauf der Penicillineinwirkung entstandene Komponenten stattgefunden haben.

Die innerhalb der Versuche in Bezug auf den Nullwert variierenden spezifischen Radioaktivitäten der DAP in P1-P4 dürfen wohl als Schwankungen aufgefaßt werden, wie sie in einem solchen biologischen System auftreten können.

Um festzustellen, ob das in den Oligopeptiden P1A1-P3A1∝ enthaltene radioaktive Material nicht ausschließlich einem Vorrat (pool) an ^{14}C-DAP entstammt, welcher sich in den Bakterien vor der Penicillineinwirkung angesammelt hatte, wurde die in den Bakterien enthaltene Menge an "pool" - DAP bestimmt. Tabelle 2 enthält eine Zusammenfassung der erhaltenen Werte: Tabelle 2.

Bestimmung der ^{14}C"pool"-DAP in 2-^{14}C-DAP markierten Bakterien vor Inkubation mit Penicillin.

Aliquots einer ^{14}C-DAP-Bakteriensuspension wurden, wie bei Material und Methoden 6. angegeben, extrahiert und die in unlöslicher Form in den Extraktionsrückständen verbliebene gesamte Radioaktivität der DAP bestimmt.

Probe x Bakteriensediment nicht extrahiert (Nullprobe)

Probe y Sediment nach Extraktion der löslichen DAP mit Na-Dodocylsulfat

Probe z Sediment nach Extraktion der löslichen DAP mit TCS

In der Tabelle ist jeweils die Radioaktivität der pro gesamtes Aliquot enthaltenen DAP angegeben. Die spezifische Radioaktivität der DAP ist entsprechend Tabelle 1 aufgeführt.

	Probe x	Probe y	Probe z
DAP-Gesamtradioaktivität im untersuchten Aliquot Ipm	14 390	12 450	13 310
Spezifische Radioaktivität der DAP im untersuchten Aliquot (Ipm/10µg DAP)	1320	1195	1215

Die Probe x, welche sowohl die lösliche als auch die im Sacculus eingebaute DAP enthält, liefert 14 390 Impulse pro Minute, welche der ^{14}C-DAP zuzuschreiben sind. Nach Extraktion der löslichen DAP sind in den Rückständen y und

z noch etwa 90 % der in x zu findenden DAP-Radioaktivität enthalten, es müssen also rund 10 % der DAP im löslichen "pool" enthalten sein.

Dies stimmt mit einem Befund von Tomasz et al.[66] überein, welche fanden, daß in der Coli-Mutante W 173-25 (DAP^-, Lys^-) unter Normalbedingungen ein "pool" von etwa 10 % löslicher DAP, berechnet auf den Gesamtgehalt der Zellen, zu finden ist.

An sich wäre es wünschenswert, den Verbleib der vor Penicillinbehandlung im Sacculus der Zellen eingebauten DAP nach Inkubation der Bakterien mit dem Antibiotikum bilanzmäßig zu erfassen. Damit könnte, zusammen mit den unter Anwendung der Isotopentechnik erhaltenen Daten, klar entschieden werden, ob die aus Penicillinsphäroplasten isolierbaren, DAP- haltigen Oligopeptide, Bruchstücke des von autolytischen Enzymen unter dem Einfluß des Antibioticums abgebauten Sacculus darstellen, ob sie degradierte Mureinvorstufen oder eine Mischung von Abbauprodukten des Mureins und von Vorstufenmaterial repräsentieren. Aus mehreren Gründen ist die Aufstellung einer DAP- Bilanz jedoch unmöglich. Einmal wird bei einer Phenolextraktion der Sphäroplasten mit Sicherheit nicht das gesamte im Verlauf der Inkubation in den Zellen anfallende, lösliche DAP- haltige Material erfaßt.

Dies deshalb nicht, weil es gelang, aus Kulturmedium, in welchem Zellen von E. coli B unter den üblichen Bedingungen mit Penicillin inkubiert und anschließend abzentrifugiert worden waren, ebenfalls DAP- haltige niedermolekulare Komponenten mit Hilfe des Jonenaustauschers DOWEX 50 zu isolieren. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß einmal ein Teil der DAP- haltigen löslichen Komponenten im Verlauf der Inkubation infolge Diffusion in das umgebende Medium übergeht, zum anderen, daß ein gewisser Anteil der Sphäroplasten platzt (s. Kap. II,3), und den Zellinhalt ins Medium abgibt. Weiter muß damit gerechnet werden, daß sowohl ein bestimmter Anteil der Murein- als auch der "pool"-DAP zu Lysin decarboxyliert[67),68)] und deshalb nicht erfaßt

wird. - Obwohl also auf die Erstellung einer DAP- Bilanz verzichtet werden muß, läßt sich die Frage nach dem Ursprung der Peptide P1A1 - P3A1α dennoch beantworten: Berechnet man die Gesamtmenge an Radioaktivität der DAP, welche in den Komponenten P1 - P4 nach Phenolextraktion von ^{14}C-DAP markierten Penicillinsphäroplasten gefunden werden kann, stellt sich heraus, daß dieser Betrag etwa 10-15 % der in den Zellen vor Zugabe des Antibioticums enthaltenen Radioaktivität der DAP ausmacht. Die Gesamtradioaktivität der schon vor Beginn der Inkubation in den Zellen enthaltenen "pool"- DAP beträgt etwa 10 % der in den Zellen enthaltenen gesamten DAP- Radioaktivität. Da nun einerseits sicher beträchtliche Mengen löslicher DAP- haltiger Komponenten im Verlaufe der Penicillinbehandlung in das Medium abgegeben werden (s.o.), darunter auch"pool"DAP, andererseits aus den Sphäroplasten aber immer noch eine dem Betrag der "pool"- DAP- Radioaktivität entsprechende oder diesen sogar überschreitende Menge DAP- Radioaktivität in den löslichen Peptiden gefunden werden kann, muß ein Teil der Peptide P1A1 - P3A1α dem ursprünglichen Murein der Zellen entstammen. Diesen Schluß lassen die oben aufgeführten Befunde zu.

Die spezifische Radioaktivität der Peptid-DAP beträgt nur etwa 20-30 %. der spezifischen Radioaktivität der vor Penicillininkubation im Sacculus eingebauten DAP. Die aus dem ursprünglich intakten Murein unter Penicillineinfluß abgespaltenen Peptide müssen also durch im Verlauf der Inkubation angesammelte Mureinvorstufen oder Hydrolyseprodukte derselben verdünnt worden sein; die geringere spezifische Radioaktivität der DAP in den Oligopeptiden läßt sich so erklären. Offensichtlich greifen die in der Bakterienzelle enthaltenen lytischen Enzyme nicht nur den intakten Sacculus an, sondern hydrolysieren auch Bruchstücke des Mureins und in der Zelle sich ansammelndes, nicht verwertbares Vorstufenmaterial des Sacculus.

In zwei Versuchen wurde ermittelt, welcher Anteil der im ursprünglichen Murein der Zellen vor Penicillinzugabe eingebauten DAP nach Inkubation mit dem Antibiotikum in den Sphäroplastenmembranen (SPM) noch enthalten ist. Wie in Material und Methoden angegeben, wurde die SPM- Suspension durch differentielles Zentrifugieren in zwei Fraktionen unterteilt, von denen eine frei von intakten Bakterien war. Da das Murein solcher von Penicillin nicht in Sphäroplasten-umgewandelter Bakterien noch intakt sein sollte, würden diese, wenn sie nicht herausfraktioniert würden, einen zu hohen DAP- Gehalt der Mischung vortäuschen. In beiden Fraktionen wurde die DAP quantitativ bestimmt. In der Tat wies die noch intakte Bakterien enthaltende Fraktion einen etwas höheren DAP- Gehalt auf, bezogen auf das Trockengewicht, als die von Bakterien befreiten Sphäroplastenmembranen. Nun wurde, ausgehend von dem für den DAP- Gehalt der reinen Sphäroplastenmembranen erhaltenen Wert, berechnet, wie groß der DAP- Gehalt der Sphäroplasten-Bakterien-Mischung wäre, wenn die Bakterien daraus entfernt werden könnten. Dabei ergibt sich, daß die Bakterien etwa einen um 5 % zu hohen DAP- Gehalt der verunreinigten Fraktion vortäuschen. Da die Bilanz nur die Bakterien der mit Penicillin inkubierten Suspension erfassen soll, welche tatsächlich auch in Sphäroplasten umgewandelt werden, wurde die den unverändert gebliebenen Bakterien zuzuschreibende DAP sowohl von der in den Bakterien vor Penicillinzugabe enthaltenen DAP (Nullprobe) als auch von der DAP der noch Bakterien enthaltenden Fraktion abgezogen. Nach dieser Korrektur wurde dann berechnet, wieviel Prozent der im Sacculus eingebauten DAP nach Penicillininkubation in den Sphäroplastenmembranen der beiden Fraktionen noch zu finden sind.

Bedingt durch die Versuchsmethode handelt es sich bei den gewonnenen Daten um Relativwerte; sämtliche Proben einer Versuchsreihe wurden genau gleich behandelt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zweier Versuche zusammengefaßt.

Tabelle 3

Bestimmung der Gesamtmenge an DAP, welche nach Inkubation von Bakterien mit Penicillin in den Sphäroplastenmembranen zurückbleibt. Die Angaben erfolgen in µg DAP, die Werte sind korrigiert (s. Text oben). Die Ergebnisse sind bezogen auf 1200 ml Inkubationsansatz (Versuch A) und auf 1160 ml Inkubationsansatz (Versuch B). Der DAP- Gesamtgehalt der Nullprobe ist gleich 100 % gesetzt; darauf bezieht sich die in den Sphäroplastenmembranen gefundene Gesamtmenge an DAP.

	DAP im Murein vor Penicillin (Nullprobe)	DAP in den SPM nach Penicillin	Prozent DAP in SPM, bezogen auf Nullprobe
Versuch A	557 µg	208 µg	37
Versuch B	510 µg	171 µg	34

Die dem in den Sphäroplastenmembranen nach Penicillinbehandlung zurückbleibenden Murein vielleicht zuzuschreibende biologische Funktion soll in einer abschließenden Diskussion der Versuchsergebnisse besprochen werden. An dieser Stelle sei nur noch kurz auf die spezifische Radioaktivität der in den SPM enthaltenen DAP eingegangen. Nimmt man an, daß die Zeit bis zum Wirkungseintritt des Penicillins in der Zelle im Vergleich zu der Generationszeit der Bakterien sehr kurz ist, müßte die in den SPM zurückbleibende DAP etwa dieselbe spezifische Radioaktivität aufweisen wie die DAP der Nullprobe - vorausgesetzt, daß die Mureinsynthese vollständig blockiert ist. Offensichtlich ist dies nicht der Fall. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, beträgt die spezifische Radioaktivität der DAP in den SPM nur etwa 77 % derjenigen des Nullwerts. Der Befund, daß Penicillin die Mureinsynthese nicht völlig blockiert, stimmt mit den Ergebnissen von Strominger et al. überein, welche bei Arbeiten mit der Coli-Mutante W 173-25 in Kurzzeitversuchen mit 100µg Penicillin pro ml, das entspricht etwa 150 E/ml, eine 75 %ige Hemmung des DAP- Einbaus feststellten[69].

Um Einzelheiten über die Zusammensetzung des in den SPM enthaltenen Mureins zu ermitteln, wurde versucht, durch Inkubation von SPM mit Lysozym lösliche Bruchstücke davon zu erhalten und diese zu charakterisieren.

Kapitel IV

Inkubation von ^{14}C-DAP-markierten Sphäroplastenmembranen mit Lysozym. Charakterisierung der dabei entstehenden löslichen Muropeptide

Material und Methoden

1. Gewinnung der mit ^{14}C-DAP markierten SPM: Wie in Kap. III unter Material und Methoden beschrieben

2. Inkubation von ^{14}C-DAP-SPM mit Lysozym

Etwa 70 mg bakterienfreie SPM werden in 5 ml 0,05 m Ammonazetatpuffer mit etwa 500 µg Lysozym/ml suspendiert und bei 37° unter Toluol über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle wird eine bekannte Menge SPM in Puffer ohne Lysozym inkubiert. Die Ansätze werden, nach Auffüllen mit Wasser auf 10 ml, 30 Minuten bei 17 300 xg abzentrifugiert und die Sedimente je 2 mal gewaschen. Die vereinigten Überstände werden je 5 mal mit Chloroform-Octanol 4:1 (v/v) entproteinisiert und im Rotationsverdampfer eingedampft. Je ein Aliquot der Rückstände wurde zur Messung der Radioaktivität auf ein Papierscheibchen aufgetragen (s. Kap. III, Material und Methoden 6.[2]).

3. Auftrennung des nach Lysozyminkubation aus SPM freigesetzten ^{14}C-DAP- haltigen Materials

9/10 des nach 2. erhaltenen Abspaltungsprodukts werden auf 10 cm MN 2214 quer zur Faser aufgetragen. Zur Kontrolle werden zusätzlich 170 µg Lysozymabspaltungsprodukt isolierter Zellwände[20] mit 1/10 des nach 2. gewonnenen radioaktiven Materials vermischt und auf 1 cm Papier für sich aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt mit 54 V/cm in 2 m Essigsäure 3 Stunden lang, wie in Kap. II,5 beschrieben. Die Banden werden im UV angezeichnet und der 1 cm breite Kontrollstreifen, welcher sowohl das radiomarkierte, aus SPM löslich gewordene Material, als auch Abspaltungsprodukt normaler isolierter Zellwände enthält, wie in Kap. II,5

beschrieben, mit Ninhydrin angefärbt. Der Kontrollstreifen wird in seiner ganzen Länge in 1,5 cm lange Abschnitte unterteilt und deren Radioaktivität entsprechend Kap. III,5b gemessen. Die Aktivität wird auf Ipm/cm Papier umgerechnet. Es stellt sich dabei heraus, daß außer radioaktivem Material, welches dieselben Laufeigenschaften aufweist wie das zur Kontrolle aufgetragene Lysozymabspaltungsprodukt (s.o.), auch noch weiter zur Kathode laufende radioaktive Komponenten (K) vorkommen. Dieses 13-22 cm weit zur Kathode gelaufene Material wird von dem nach Ausschneiden des Kontrollstreifens noch übrigen Pherogramm mit Wasser eluiert (s. Kap. II,5) und das eingedampfte Eluat auf 3 cm gewaschenes MN 2214 Papier[25] neben 175 µg Lysozymabspaltungsprodukt (s.o.) aufgetragen. Dann wird 34 Stunden lang in System 1 (Kap. II,6) chromatografiert. Der Kontrollstreifen wird wie üblich angefärbt, ferner wird die Radioaktivität in einem 1 cm breiten Kontrollstreifen des chromatografierten Materials K bestimmt. Der weitaus größte Teil der Radioaktivität ist in der Zone zwischen Startfleck und 7,5 cm Laufstrecke lokalisiert. Nach Elution dieser Zone mit Wasser wird das eingedampfte Eluat in 1 ml 4 n HCl 14 Stunden bei 100° hydrolysiert und von der Hälfte des Hydrolysats nach Eindampfen ein zweidimensionales Chromatogramm hergestellt.

4. Zweidimensionale Chromatografie der Fraktion K

Die Chromatografie und anschließende Anfärbung der Chromatogramme wurde nach der in Kap. II,9 angegebenen Methode durchgeführt.

5. Bestimmung der nach Lysozyminkubation in ^{14}C-DAP-markierten SPM zurückbleibenden Radioaktivität

Da durch Inkubation von SPM in lysozymfreiem Puffer praktisch kein radioaktives Material löslich wird, darf angenommen werden, daß ausschließlich radioaktive Muropeptide aus SPM mit Lysozym im Freiheit gesetzt werden. Es wurde deshalb auf die quantitative DAP- Bestimmung verzichtet;

aliquote Hydrolysate der Sphäroplastenmembranen vor und nach Lysozymverdauung wurden auf Papierscheibchen aufgetragen und die Radioaktivität gemessen. Aus diesen Werten wurde dann die Menge des löslich gewordenen radioaktiven Muropeptidmaterials berechnet. Ferner wurde nach der in Kap. III,7 angegebenen Methode festgestellt, welcher Anteil der im ursprünglichen Murein der Zelle eingebauten DAP in SPM noch zu finden ist. Die Menge des nach der Lysozymverdauung im Rückstand der SPM noch enthaltenen DAP wurde auf dieselbe Weise ermittelt.

Ergebnisse und Diskussion

In den zur Inkubation mit Lysozym eingesetzten Sphäroplastenmembranen waren noch etwa 35 % der im Murein ursprünglich eingebauten DAP enthalten (s. Tabelle 3). Vor der Lysozymverdauung gaben 10 mg dieser Substanz 1800 Ipm, nach der Lysozymverdauung enthielt der 10 mg Ausgangsmaterial entsprechende Rückstand 1180 Ipm. Werden diese beiden Werte in Beziehung zu den in den SPM noch enthaltenen 35 % des Ausgangswertes gesetzt, ergibt sich, daß nach der Lysozymverdauung von SPM noch etwa 20 % der im ursprünglichen Murein der Zellen eingebauten DAP zu finden sind. Dieser Wert stimmt recht gut mit den Daten von Martin et al.[9] überein, welche fanden, daß in Zellwänden, deren Sacculus noch kovalent gebundenes Zubehörmaterial ("Kügelchen") enthält (s. Einleitung), etwa 20 % des Mureins in einer für Lysozym nicht zugänglichen Form vorliegen. Es scheint offensichtlich so zu sein, daß auch in vivo gewisse Areale des Mureins im Sacculus entweder autolytisch wirkenden Mureinasen nicht zugänglich sind, oder daß vielleicht die Mureinasen strukturgebundene Enzyme darstellen, welche so angeordnet sind, daß gewisse Zonen des Sacculus nicht mit diesen das Murein abbauenden Enzymen bestückt sind. Es ist durchaus denkbar, daß auch in der lebenden Zelle die von den "Kügelchen" besetzten Gebiete des Sacculus

durch autolytische Enzyme nicht abgebaut werden.

Auf den Elektropherogrammen des aus SPM freigesetzten radioaktiven Materials traten außer den üblichen, im Gesamtabspaltungsprodukt normaler isolierter Zellwände[20] enthaltenen Komponenten auch noch Substanzen auf, welche unter den angewandten Elektrophoresebedingungen weiter zur Kathode wanderten. Wird Gesamtabspaltungsprodukt der Elektrophorese unterworfen, trennt es sich im Wesentlichen in 3 ninhydrinpositive Hauptkomponenten auf[70]. Der am weitesten zur Kathode wandernde Fleck enthält u.a. aus je zwei C6 bzw. zwei C5 Molekülen bestehende oligomere Muropeptide[25], dann folgen in Richtung Startpunkt C5 + C6 in einer Bande und C3 + C4 ebenfalls zusammen in einer Fraktion.

Einem Teil des nach Lysozymbehandlung von ^{14}C-DAP- markierten SPM gewonnenen löslichen Materials wurde Lysozymabspaltungsprodukt isolierter Zellwände (s.o.) als Trägersubstanz beigefügt. Auf einem Elektropherogramm dieses Gemischs ist die Radioaktivität entsprechend dem folgenden Diagramm verteilt:

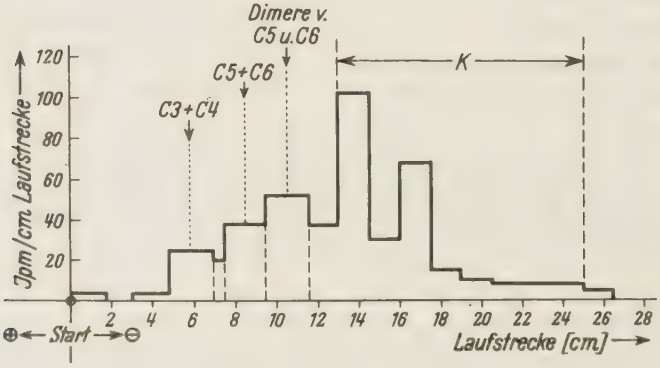


Abb. 4

Verteilung der Radioaktivität auf einem Mischelektropherogramm von Lysozymabspaltungsprodukt isolierter Zellwände und von Material, welches durch Lysozymverdauung von ^{14}C-DAP- markierten SPM gewonnen wurde.
Auf der Abszisse aufgetragen: Laufstrecke in cm
Auf der Ordinate aufgetragen: Ipm pro cm Laufstrecke
Die Position der ninhydrinpositiven Flecke ist durch Pfeile angegeben.

Das vom Pherogramm eluierte Material K hat in dem Chromatografiegemisch 1 etwa die Laufeigenschaften von C3. Ein zweidimensionales Chromatogramm der durch Papierchromatografie noch weiter gereinigten K-Substanzen (s. Material und Methoden) zeigt neben den üblichen Bausteinen des Mureins, nämlich Muraminsäure, Glukosamin, DAP, Glu und Ala das Vorkommen der Aminosäuren Asp, Gly, Ser in größeren Mengen. Daneben kommen noch in geringerer Konzentration die Aminosäuren Lys, Thr , Val, Arg und Leu vor. Da alle diese Aminosäuren in den als Zubehör des Sacculus bekannten Kügelchen[8), 9)] zu finden sind, liegt es nahe, anzunehmen, daß in K Muropeptide enthalten sind, welche noch kovalent gebundene Bruchstücke des Kügelchenproteins tragen. Da diese K-Substanzen üblicherweise bei der Lysozymverdauung normaler, noch mit Kügelchen besetzter Sacculi, nicht auftreten, kann vermutet werden, daß entweder während der Penicillininkubation die Synthese neuer Kügelchen zwar begonnen, jedoch nicht zu Ende geführt wird und,daß bei Lysozymbehandlung der Sphäroplastenmembranen die mit diesem nicht fertig synthetisierten Kügelchenprotein verbundenen Muropeptide freigesetzt werden, oder daß während der Penicillininkubation proteolytische Enzyme das Kügelchenprotein zu einem geringen Teil angreifen. Allerdings müßte man in diesem Fall annehmen, daß der weitaus größte Teil des Kügelchenproteins dabei noch intakt bliebe, weil nach Lysozyminkubation in SPM immer noch 20 % des ursprünglichen Mureins enthalten sind, wahrscheinlich eben durch Kügelchenprotein gegen enzymatischen Abbau geschützt (s.o.). Da nach Inkubation von Bakterien mit Penicillin nur noch etwa 35 % des ursprünglichen Mureins in den SPM zu finden sind und von diesem Rest der größte Teil wahrscheinlich durch Kügelchenprotein sowohl gegen den Angriff autolytischer Enzyme als auch gegen einen Abbau durch Eiweißlysozym geschützt ist, liegt die Vermutung nahe, daß unter Penicillin die nicht von Kügelchen bedeckten Areale des Mureins durch zelleigene Mureinasen abgebaut werden. Aus den Versuchsergebnissen geht allerdings nicht hervor, wie weitgehend ein solcher Abbau erfolgt. Es ist an sich denkbar, daß

allein die Abspaltung der Peptidseitenketten oder die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen den Seitenketten von C3, dem wahrscheinlich die Polysaccharidketten verknüpfenden Bindeglied im Murein (s. Einleitung), den Verlust des festen Zusammenhalts des Sacculus zur Folge haben kann.

Da die gewonnenen Daten nur Aussagen über die Verteilung der DAP im Verlaufe der Penicillineinwirkung gestatten, muß die Frage nach dem Schicksal des Aminozuckergerüsts unter diesen Bedingungen noch unbeantwortet bleiben. Daß im Verlauf der beschriebenen Experimente keine aminozuckerhaltigen Mureinspaltprodukte isoliert werden konnten, bedeutet nicht, daß sie nicht tatsächlich doch als intermediäre Abbauprodukte entstanden. Falls es sich um Substanzen wie C6 handeln sollte, würden sie ja eben weiterhydrolysiert werden. Die dabei entstehenden freien Aminozucker könnten infolge metabolischer Veränderungen leicht unauffindbar werden. In nur kurzzeitig mit Penicillin inkubierten Zellen wäre es vielleicht möglich, die eigentlichen primären Bruchstücke des Mureins zu finden.

Auf einige Fragen, welche sich aus den beschriebenen Befunden ergeben, soll in einer abschließenden zusammenfassenden Diskussion eingegangen werden.

Zusammenfassende Diskussion

In mehreren Arbeiten[71)-73)] war darauf hingewiesen worden, daß in den "Wänden" und in dem mit Trichloressigsäure fällbaren Material penicillinbehandelter gramnegativer Zellen viel weniger DAP zu finden ist, bezogen auf das Trokkengewicht, als in den Fraktionen unbehandelter Bakterien. Jedoch war nicht klar gezeigt worden, daß tatsächlich nach der Inkubation mit Penicillin im Trichloressigsäurepräzipitat absolut weniger DAP zu finden ist als vor Einwirkung des Antibioticums. Da während der Penicillinbehandlung die

Zellen an Masse zunehmen[2), 5), 75)], die Mureinsynthese jedoch weitgehend gehemmt ist, muß auf jeden Fall eine relative Verdünnung der DAP erfolgen. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit geht nun eindeutig hervor, daß unter Penicillineinfluß auch eine absolute Abnahme des DAP- Gehalts in den Zellwänden stattfindet; allerdings bleibt ein gewisser konstanter Betrag des ursprünglichen Mureins in den Sphäroplastenmembranen zurück. Dieses Material erfüllt mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige biologische Funktion bei einer Reversion der osmotisch sensitiven Sphäroplasten zur stabilen, intakten Stäbchenform. Kandler et al.[74)] zeigten, daß in dem nach Alkaliextraktion stabiler Proteus L- Formen verbleibenden Rückstand keinerlei DAP vorkommt, während der aus instabilen L-Formen gewonnene Rückstand sowohl DAP als auch Muraminsäure enthält. Die penicillininduzierten, auch in penicillinfreiem Medium erhalten bleibenden und sich vermehrenden L-Formen können nicht mehr revertieren, die instabilen L- Formen sind dazu nach Entfernung des Penicillins in der Lage[5)]. Wahrscheinlich ist eine Reparatur der durch Penicillin im Murein hervorgerufenen Schäden nur dann möglich, wenn in der Zellwand noch Reste des Mureins vorhanden sind, von denen ausgehend die Resynthese eines intakten Sacculus erfolgen kann. Das Restmurein hätte dabei die Funktion eines Startmaterials (primer)[4), 76), 78), 79)]. Verliert die Zelle dieses Material, wie dies bei der stabilen L-Form tatsächlich der Fall ist, geht sie damit automatisch der Fähigkeit verlustig, die Synthese eben dieser Substanz, des Mureins, bewerkstelligen zu können.

Dies könnte als eine durch Penicillin induzierte, nicht am Genom fixierte Mutation bezeichnet werden[77), 78)]. Damit läßt sich auch vereinbaren, daß der Übergang von der Stäbchen- über die instabile - zur stabilen L-Form nicht spontan, sondern erst im Verlauf mehrerer Passagen in penicillinhaltigem Medium erfolgt[76)]. Vielleicht ist der Grund für diesen gleitenden Übergang der, daß die L- Formen zwar zur Zellteilung befähigt sind, die Mureinsynthese und

damit auch die Synthese des "primers" jedoch stark gehemmt ist. Im Verlaufe mehrerer Passagen würde der "primer" gewissermaßen "herausverdünnt".

Ob nur bestimmte Komponenten des Mureins eine solche "primer"-Funktion ausüben können, läßt sich im Augenblick nicht sagen. Wie eigene Untersuchungen ergaben, enthalten auch mit Lysozym induzierte Sphäroplasten von E. coli noch Reste des ursprünglichen Mureins, können jedoch nicht[80] oder nur in sehr beschränktem Maße[81] zur normalen Stäbchenform revertieren. Dies steht nicht unbedingt im Widerspruch zu der oben erwähnten "primer"-Theorie, da sehr wahrscheinlich durch die üblichen, zur Herstellung von Lysozymsphäroplasten angewandten Methoden[81-83] gewisse irreparable Schädigungen der für die Mureinsynthese und damit für eine Reversion erforderlichen Zellkomponenten erfolgen. Neuere Untersuchungen zeigten[84], daß auch Lysozymsphäroplasten, allerdings nach einer sehr schonenden Methode hergestellt[85], durchaus zur Reversion befähigt sind.

Penicillin blockiert wahrscheinlich den letzten oder einen der letzten Schritte in der Synthesekette, welche über verschiedene, Schritt für Schritt synthetisierte Vorstufen[86,87] zum Makromolekül des Sacculus führt. Über die Art dieser Blockierung kann im Augenblick nur spekuliert werden. Es ist denkbar, daß Penicillin mit einer funktionellen Gruppe des "primers" eine irreversible Bindung eingeht. Weiter muß daran gedacht werden, daß der endgültige Zusammenbau der niedermolekularen Vorstufen zum hochmolekularen Sacculus vielleicht an einer dem Murein angelagerten spezifischen Zellstruktur erfolgt und an dieser Stelle die eigentliche Hemmung der Mureinsynthese erfolgt. Auch wurde auf Grund stereochemischer Ähnlichkeit zwischen Penicillin und Muraminsäure[88] die Ansicht geäußert, das Antibioticum blockiere ein Enzym, welches den Einbau von Vorstufenmaterial durch eine Transglykosidierung[42] vermittelt. Auf Grund der Tatsache, daß in penicillinbehandelten Zellen von Staph. aur. 3 verschiedene Uridinnukleotide isoliert werden können[89], wurde vermutet, Penicillin blockiere mehre-

re Schritte in der zum Murein führenden Synthesekette[90]. Eine solche Annahme ist nicht unbedingt erforderlich, da vielleicht auch in grampositiven Zellen ein partieller Abbau von Vorstufenmaterial durch, wenn vielleicht auch in geringerer Konzentration als bei Gramnegativen, enthaltene Mureinasen und Muropeptid Hydrolasen erfolgen kann.

Das Auffinden von Reaktionsprodukten solcher Mureinasen, der zum Teil dem Murein entstammenden Oligopeptide P1A1 bis P3A1α stellt eine Stütze für die in der Einleitung erwähnte Theorie über den Ausbau des Mureins in der wachsenden Zelle dar. Wahrscheinlich muß in dem geschlossenen Sacculus durch das Lösen von Bindungen an den Wachstumsstellen Platz für den Einbau neuen Materials geschaffen werden. Eine solche der Synthese vorausgehende Lyse macht die Erweiterung des Sacculus und damit ein Wachstum der Zelle erst möglich. Vielleicht stellen die Mureinasen strukturgebundene, in enger Nachbarschaft zu ihrem Substrat angeordnete Enzyme dar. So könnten sie ihre Funktion ausüben, ohne daß parallel dazu das intrazellulär gebildete Vorstufenmaterial weitgehend wieder abgebaut wird. Ein solcher Abbau träte erst dann ein, wenn durch den Eingriff von Penicillin das balancierte System der für den Bau und das Wachstum des Sacculus zuständigen abbauenden und synthetisierenden Enzyme aus dem Gleichgewicht gebracht wird.

Zusammenfassung

Aus Penicillinsphäroplasten von E. coli B wurden DAP- haltige Oligopeptide isoliert. Eines dieser Peptide stimmt im chemischen Aufbau mit dem Peptidrest der in der Zellwand eingebauten Muropeptide überein. Die übrigen isolierten Substanzen können als Produkte einer enzymatischen Partialhydrolyse dieses Peptids angesehen werden. Weiter war es möglich, aus den Sphäroplasten Komponenten mit den Eigenschaften der als Vorstufenmaterial des Sacculus angesehenen Uridindiphosphat-Muramylpeptide zu gewinnen.

In Radiomarkierungsversuchen mit ^{14}C- Diaminopimelinsäure wurde gezeigt, daß die isolierten Peptide unter der Wirkung zelleigener lytischer Enzyme zum Teil aus dem vor Penicillinzugabe in den Zellen enthaltenen Murein, zum Teil aus sich unter Penicillin in den Zellen ansammelnden Mureinvorstufen freigesetzt werden. In den isolierten Sphäroplastenmembranen bleibt ein Teil des ursprünglichen Mureins zurück; die mögliche biologische Funktion dieses Materials wird diskutiert. Die Ergebnisse werden im Rahmen derzeit vertretener Anschauungen über die Penicillinwirkung besprochen und es wird versucht, die gewonnenen Daten der Theorie über das Wachstum des Sacculus[12)] einzuordnen.

Literaturverzeichnis

1) J.P. Duguid, Edinb.med.J. 53, 401 (1946)

2) J. Lederberg, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 42, 574 (1956)

3) J. Lederberg, J.Bacteriol. 73, 144 (1957)

4) J. Lederberg and J.St. Clair, J.Bacteriol. 75, 143 (1958)

5) E. Kellenberger und E. Liebermeister, Z.Naturforsch. 11b, 200 (1956)

6) F.E. Hahn and J. Ciak, Science, 125, 119 (1957)

7) S. Brenner et al., Nature, London, 181, 1713 (1958)

8) W. Weidel, H. Frank and H.H. Martin, J.Gen. Microbiol. 22, 158 (1960)

9) H.H. Martin und H. Frank, Z.Naturforsch. 17b 190 (1962)

10) W. Leutgeb, D. Maass und W. Weidel, Z.Naturforsch.II in Druck

11) W. Leutgeb und W. Weidel, Z.Naturforsch.I in Druck

12) W.Weidel and H. Pelzer, in F.F. Nord "Advances in Enzymology". Interscience Publishers, New York, in Druck

13) H.H. Martin und H. Frank, Zentralbl. Bakteriol.Paras.Inf. Hyg. 184, 306 (1962)

14) W. Weidel, H. Frank and W. Leutgeb, J.Gen.Microbiol. 30, 127 (1963)

15) H. Frank und H.H. Martin, Proc.Eur.Reg.Conf. on Electron Microscopy, Delft 1960, Vol. II p. 1024 (1960)

16) W. Weidel, Z.Naturforsch. 6b, 251 (1951)

17) G. Koch und W. Weidel, Z.Naturforsch. 11b, 345 (1956)

18) W. Weidel und J. Primosigh, Z.Naturforsch. 12b, 421 (1957)

19) W. Weidel and J. Primosigh, J. Gen.Microbiol. 18, 513 (1958)

20) J. Primosigh, H. Pelzer, D. Maass and W. Weidel, Biochim.Biophys.Acta, 46, 68 (1961)

22) H. Pelzer, Biochim.Biophys. Acta, 63,229 (1962)

21) D. Maass and W. Weidel, Biochim. Biophys. Acta, in Druck

23) H. Pelzer und D. Maass, unveröffentl. Ergebnisse

24) H. Pelzer, Z.Naturforsch. in Druck

25) W. Leutgeb und W. Weidel, Z.Naturforsch. III in Druck

26) H. Pelzer und D. Maass, Naturwiss. in Druck

27) W. Brumfitt, A.C. Wardlaw and J.T. Park, Nature, London, 181, 1783 (1958)

28) M.R.J. Salton and J.M. Ghuysen, Biochim. Biophys. Acta, 45, 355 (1960)

29) H.R. Perkins, Biochem.J. 74, 182 (1960)

30) L.R. Berger and R.S. Weiser, Biochim. Biophys. Acta, 26, 517 (1957)

31) R.M. Krause and M. Mc Carty, J.exp.Med. 114,127 (1961)

32) R.M. Krause and M. Mc Carty, J.exp.Med. 115, 49 (1962)

33) M.H. Mandelstam and J.L. Strominger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 466 (1961)

34) H. Heymann, L.D. Zelenik and J.A. Maniello, J.Am.chem.Soc. 83, 4859 (1961)

35) J.M. Ghuysen, M. Leyh-Bouille and L. Dierickx, Biochim.Biophys. Acta, 63, 297 (1962)

36) H.J. Rogers, Biochemical Society Symposium, 22, 55 (1962)

37) H.R. Perkins, Bacteriol. Rev. 27, 18 (1963)

38) J.M. Ghuysen and M.R.J. Salton, Biochim.Biophys. Acta, 40, 462 (1960)

39) J.M. Ghuysen, Biochim.Biophys. Acta, 47, 561 (1961)

40) J.T. Park and M. Johnson, J.Biol.Chem. 179, 585 (1949)

41) J.T. Park, J.Biol.Chem. 194, 877; 885; 897 (1952)

42) J.T. Park and J.L.Strominger, Science 125, 99 (1957)

43) J.L. Strominger, Compt.rend.trav. Lab.Carlsberg, 31, 181 (1959)

44) J.L. Strominger, J.T. Park and R. Thompson, J.Biol.Chem. 234, 3263 (1959)

45) J.L. Strominger and R.H.Threnn, Biochim.Biophys. Acta, 33, 280 (1959)

46) R.G.E. Murray, W.H. Francombe and B.H.Mayall, Canad. J.Microbiol. 5, 641 (1959)

47) G. Toennies and G.D. Shockman, IV. Intern.Congr.Biochem. Wien, Vol. XIII, Colloquia, p. 365, Pergamon Press, London (1958)

48) K. Mc. Quillen in J.C. Gunsalus and R.Y. Stanier "The Bacteria", Vol. I, p. 249, Academic Press, New York (1960)

49) W.B. Hugo and A.D. Russell, J. Pharm.Pharmacol. 13, 705 (1961)

50) E. Work, Biochem. J. 49, 17 (1951)

51) L.E. Rhuland, Nature, London, 185, 224 (1960)

52) W. Mathias, Der Züchter, 24, 313 (1954)

53) W. Mathias, Naturwiss. 43, 351 (1956)

54) L.E. Rhuland, E. Work, R.F. Denman and D.S. Hoare, J.Am.Chem.Soc. 77, 4844 (1955)

55) A.M. Katz, W.J. Dreyer and C.B. Anfinsen, J.Biol.Chem. 234, 2897 (1959)

56) N. Pfennig, Naturwiss. 41, 62 (1954)

57) A.D. Hershey, J. Dixon and M. Chase, J.Gen.Physiol. 36, 777 (1953)

58) D.J. Smith and R. Markham, Biochem.J. 45, 294 (1949)

59) H. Pelzer, Z.Naturforsch. in Druck

60) H. Pelzer, Z.Naturforsch. in Druck

61) P. Mandelstam, R. Loercher and J.L. Strominger, J.Biol.Chem. 237, 2683 (1962)

62) A.D. Hershey and M. Chase, J.Gen.Physiol. 36, 39 (1952)

63) W.F. Bousquet and J.E. Christian, Anal.Chem. 32, 722 (1960)

64) J.H. Matthaei, persönl. Mitteilung

65) E. Work, Biochem.J. 67, 416 (1957)

66) A. Tomasz and E. Borek, Biochemistry 1, 543 (1962)

67) D.L. Dewey and E. Work, Nature, London, 169, 533 (1952)

68) B.D. Davis, Nature, London, 169, 534 (1952)

69) S.G. Nathenson and J.L. Strominger, J.Pharm.Exptl.Therap. 131, 1 (1961)

70) H. Pelzer, unveröffentl. Ergebnisse

71) M.R.J. Salton and F. Shafa, Nature, London, 181, 1321 (1958)

72) K. Mc Quillen, J.Gen.Microbiol. 18, 498 (1958)

73) E.B. Wylie and M.J. Johnson, Biochim.Biophys. Acta, 59, 450 (1962)

74) O. Kandler, A. Hund und C. Zehender, Nature, London, 181, 572 (1958)

75) M.V. Nermut and V. Drašil, Nature, London, 181, 1740 (1958)

76) E. Klieneberger in J.C. Gunsalus and R.Y. Stanier "The Bacteria", Vol. I, p. 361, Academic Press, New York (1960)

77) O.E. Landman and H.S. Ginoza, Bacteriol.Proc. 1960, 74 (1960)

78) U. Taubeneck, Monatsber. deut. Akad.Wiss., Berlin, 2, 36 (1960)

79) O.E. Landman and H.S. Ginoza, J.Bacteriol. 81, 875 (1961)

80) Fraser, zitiert bei K. Mc Quillen in J.C. Gunsalus and R.Y. Stanier "The Bacteria", Vol. I, p. 249, Academic Press, New York (1960)

81) N.D. Zinder and W.F. Arndt, Proc.Nat. Acad.Sci. U.S. 42, 586 (1956)

82) R. Repaske, Biochim.Biophys. Acta, 22, 189 (1956)

83) H.R. Mahler and D. Fraser, Biochim.Biophys. Acta, 22, 197 (1956)

84) M.V. Nermut and A. Svoboda, Nature, London, 193, 396 (1962)

85) A. Kohn J.Bact. 79, 697 (1960)

86) J.L. Strominger and R.H.Threnn, Biochim.Biophys. Acta, 36, 83 (1959)

87) J.L. Strominger, Physiol.Rev. 40, 55 (1960)

88) J.F. Collins and M.H. Richmond, Nature, London 195, 142 (1962)

89) J.L. Strominger, J.Biol.Chem. 224, 509 (1957)

90) J.L. Strominger in J.C. Gunsalus and R.Y. Stanier "The Bacteria", Vol. III, p. 431, Academic Press, New York (1962)

Herrn Dr.J.H. Matthaei bin ich zu Dank verpflichtet für die mir gegebene Möglichkeit, den Flüssigkeitsszintillationszähler TRI-CARB zu benützen.

Das für die Untersuchungen verwendete Penicillin G Natrium wurde von der Farbwerke Hoechst AG kostenlos zur Verfügung gestellt. Dafür sei an dieser Stelle gedankt.

Lebenslauf

Am 10. Juli 1934 wurde ich als Sohn des Fachschuloberlehrers Gustav Schwarz und seiner Frau Anny, geb. Elliker, in Biberach an der Riß geboren. Nach dem Besuch der Volksschule Biberach besuchte ich von November 1945 bis März 1954 das Wieland-Gymnasium in Biberach und erhielt dort am 29. März 1954 das Reifezeugnis.

Da ich mich zum Studium der Pharmazie entschlossen hatte, leistete ich von April 1954 bis März 1956 die vorgeschriebene Zeit als Apothekerpraktikant in der Adler-Apotheke Kirchheim/Teck ab und erhielt am 16. März 1956 das Zeugnis über die pharmazeutische Vorprüfung. Nach 6 Semestern Studium am von Herrn Professor Dr.W. Hückel geleiteten pharmazeutisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen bestand ich am 30. April 1959 das pharmazeutische Staatsexamen in Tübingen. Von Mai bis November 1959 arbeitete ich anschließend als Kandidat der Pharmazie nochmals in meiner Lehrapotheke; meine Bestallung als Apotheker erfolgte am 18. Mai 1960 vom Innenministerium des Landes Baden-Württemberg.

Von Januar 1960 an arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr.Dr. W. Weidel am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Weidel, an meiner Doktorarbeit.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich den Herren Professoren und Dozenten: H.Auterhoff (Pharmazie), E.Bünning (Botanik), W.Hückel (Pharmazeutische Chemie), K.Hummel (Pharmakognosie), Kiese (Pharmakologie), H.Krüger (Experimentalphysik), E.Müller (Chemie), G.Weitzel (Physiologische Chemie), G.Wittig (Chemie), W.Zimmermann (Spezielle Botanik).

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen